

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平9-327291

(43) 公開日 平成9年(1997)12月22日

(51) Int.Cl. ⁸	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 1 2 N 15/09		9282-4B	C 1 2 N 15/00	A
C 0 7 H 1/08			C 0 7 H 1/08	
	21/02		21/02	
C 1 2 Q 1/68		7823-4B	C 1 2 Q 1/68	A

審査請求 未請求 請求項の数11 O L (全 6 頁)

(21) 出願番号	特願平8-149128	(71) 出願人	000003160 東洋紡績株式会社 大阪府大阪市北区堂島浜2丁目2番8号
(22) 出願日	平成8年(1996)6月11日	(72) 発明者	石田 由和 福井県敦賀市東洋町10番24号 東洋紡績株式会社敦賀バイオ研究所内
		(72) 発明者	池田 勝徳 福井県敦賀市東洋町10番24号 東洋紡績株式会社敦賀バイオ研究所内
		(72) 発明者	上村 秀喜 福井県敦賀市東洋町10番24号 東洋紡績株式会社敦賀バイオ研究所内

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 RNAの抽出精製方法

(57) 【要約】

【課題】 細胞等の生物材料からRNAを煩雑な操作を必要とすることなく、短時間かつ高純度でRNAを抽出し、精製する方法を提供する。

【解決手段】 下記工程(a)～(c)を含むことを特徴とするRNAの抽出精製方法および該方法に使用するRNAの抽出精製試薬キット。

(a) 細胞等の生物材料に、カオトロピック物質を含む溶解液、有機溶媒からなる抽出液、および核酸結合性固相担体を酸性条件、好ましくはpH3～6にて添加、混合あるいは接触させることにより、生物材料に含まれるRNAを固相上に吸着させ、(b) 上記(a)工程にてRNAを吸着させた固相担体を洗浄液により洗浄し、

(c) 上記(b)工程にて洗浄した固相から、溶出液によりRNAを溶出させる。

18

【特許請求の範囲】

【請求項1】 下記工程（a）～（c）を含むことを特徴とするRNAの抽出精製方法。

（a）細胞等の生物材料に、カオトロピック物質を含む溶解液、有機溶媒からなる抽出液、および核酸結合性固相担体を酸性条件下に添加、混合あるいは接触させることにより、生物材料に含まれるRNAを固相上に吸着させ、

（b）上記（a）工程にてRNAを吸着させた固相担体を洗浄液により洗浄し、

（c）上記（b）工程にて洗浄した固相から、溶出液によりRNAを溶出させる。

【請求項2】 酸性条件がpH3～6である請求項1記載のRNAの抽出精製方法。

【請求項3】 カオトロピック物質を含む溶解液のpHが3～6である請求項1記載のRNAの抽出精製方法。

【請求項4】 カオトロピック物質がグアニジンチオシアン酸塩である請求項1に記載のRNAの抽出精製方法。

【請求項5】 有機溶媒が水飽和フェノールまたは緩衝液飽和フェノール、クロロホルム、またはこれらの組み合わせである請求項1記載のRNAの抽出精製方法。

【請求項6】 核酸結合性固相担体がシリカを含む担体である請求項1記載のRNAの抽出精製方法。

【請求項7】 核酸結合性固相担体が粒子である請求項1記載のRNAの抽出精製方法。

【請求項8】 核酸結合性固相担体が超常磁性金属酸化物を含む粒子である請求項1記載のRNAの抽出精製方法。

【請求項9】 抽出液が水あるいはTEバッファーである請求項1記載のRNAの抽出精製方法。

【請求項10】 核酸結合性固相担体が超常磁性金属酸化物を含む担体であって、さらに、磁力を利用して核酸結合性固相担体と液相を分離する工程を含むことを特徴とする請求項1記載のRNAの抽出精製方法。

【請求項11】 カオトロピック物質を含む溶解液、pH3～6の緩衝液、有機溶媒からなる抽出液、核酸結合性固相担体、洗浄液および溶出液を含むRNAの抽出精製試薬キット。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は細胞等の生物材料から、核酸結合性固相担体を用いてRNAを簡便かつ純度よく抽出精製する方法ならびに該方法に用いるRNAを抽出精製するための試薬キットに関する。該試薬キットは自動核酸抽出装置にも応用しうる。

【0002】

【従来の技術】核酸を含有する細胞等の生物材料からの核酸の抽出精製は、遺伝子工学や臨床診断の分野では重要なステップである。例えば、ある遺伝子について解析

しようとする場合、まず、その遺伝子を保持する細胞等の生物材料からDNAやRNAといった核酸を抽出することが必要である。また、細菌やウイルスといった感染体の検出のためのDNA/RNA診断においても、血液等の生物材料から細菌やウイルスの核酸を抽出した後、検出することが必要である。一般に、生物材料に含まれるDNAやRNAといった核酸は、遊離した状態で存在するわけではなく、タンパク質、脂質、糖から構成される細胞膜や細胞壁等の殻の中に存在し、ほとんどの場合、核酸自身もタンパク質との複合体を形成している。したがって、生物材料から核酸を抽出精製する場合には、まず超音波や熱による物理的破砕処理やプロテアーゼによる酵素処理、界面活性剤や変性剤による処理等を実施することにより核酸を遊離させ、さらに、フェノール等の有機溶媒による抽出操作や超遠心分離、イオン交換体等の担体を使用したカラムクロマトグラフィー等により、破砕物中から核酸を精製する必要がある。これらの手法は、核酸や出発材料、さらには抽出した核酸の用途に応じて組み合わせられ、それぞれ最適化されて用いられている。

【0003】細胞等の生物材料からRNAを抽出精製する方法としては、いわゆるAGPC法[Analytical Biochemistry 162, 156-159 (1987)]が一般的によく用いられている。この方法は、（1）細胞等の生物材料にグアニジンチオシアン酸塩とフェノール、クロロホルムを含む溶液を順次、添加して細胞膜や細胞壁を破壊し、核酸に結合しているタンパク質を変性させ、さらにゲノムDNAを有機相へ分配させ、（2）遠心分離によりRNAが含まれる水相のみを分離し、（3）この水相にエタノール又はイソプロパノールを添加することによりRNAを不溶化させ（エタノール沈殿法又はイソプロパノール沈殿法）、（4）さらに遠心分離によってRNAのみを分離させることを利用した方法である。このAGPC法は、他の超遠心分離法を利用するRNA抽出精製法と比較して、短時間かつ簡便にRNAが得られるという長所がある。しかし、この方法には遠心分離や水相の分離という煩雑な操作や、エタノール沈殿法あるいはイソプロパノール沈殿法という長時間を要するステップが必要なため、特に臨床診断など多サンプルを迅速に解析する必要がある場合には、より簡便かつ短時間でRNAが抽出精製できる方法が要求される。

【0004】一方、簡便な核酸抽出法としてシリカを核酸結合性固相担体として使用する方法がある[特開平2-289596号公報]。この方法は、細胞などの生物材料から核酸を一段階で抽出することが可能なので、溶出液として水またはTEバッファーなど低濃度の緩衝液を使用するため、エタノール沈殿法などの脱塩、濃縮のための操作を経ることなく、抽出した核酸を直ちに後の解析に直接使用することができるという利点がある。しかし、この方法により細胞からRNAの抽出を試みた場合、ゲノムDNAもRNAと同様にシリカ担体へ吸着するため、

回収液中にはRNAのほかにも多量のゲノムDNAが混入する。そのため、RNAのみを得るためには、さらに酵素処理や超遠心分離、カラムクロマトグラフィー等の精製操作をおこなうことが必須である。

【0005】

【発明が解決しようとする課題】本発明の目的は、従来から存在する技術の上記問題点を解決することであり、細胞等の生物材料からRNAを煩雑な操作を必要とすることなく、短時間かつ高純度でRNAを抽出し、精製する方法を提供することである。

【0006】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、上記課題を解決するために鋭意検討した結果、適当なpHを有する溶解液、有機溶媒、および核酸結合性固相担体により、生物材料からRNAを簡便に抽出精製し得ることを見出し、本発明に達した。

【0007】すなわち、本発明は、下記工程（a）～（c）を含むことを特徴とするRNAの抽出精製方法である。

（a）細胞等の生物材料に、カオトロピック物質を含む溶解液、有機溶媒からなる抽出液、および核酸結合性固相担体を酸性条件下に添加、混合あるいは接触させることにより、生物材料に含まれるRNAを固相上に吸着させ、（b）上記（a）工程にてRNAを吸着させた固相担体を洗浄液により洗浄し、（c）上記（b）工程にて洗浄した固相から、溶出液によりRNAを溶出させる。

【0008】本発明では、核酸結合性固相担体が超常磁性金属酸化物を含む粒子であって、さらに磁力を利用して核酸結合性固相担体と液相を分離する工程を含むことがある。

【0009】また、本発明はカオトロピック物質を含む溶解液、pH3～6の緩衝液、有機溶媒からなる抽出液、核酸結合性固相担体、洗浄液および溶出液を含むRNAの抽出精製試薬キットである。

【0010】

【発明の実施態様】本発明によるRNAの抽出精製方法は、（a）溶解・吸着工程、（b）洗浄工程、（c）溶出工程の3段階に大きく分けられる。

【0011】（a）溶解・吸着工程では、細胞等の生物材料に細胞溶解液、有機溶媒、核酸結合性固相担体を酸性条件下に添加、混合あるいは接触させることにより、生物材料を溶解し、生物材料に含まれるRNAを核酸結合性固相へ吸着させる。上記溶解液、有機溶媒、核酸結合性固相担体を細胞等の生物材料に、別々に添加しても、あるいは同時に添加しても良い。本発明においては、カオトロピック物質を含む溶解液、有機溶媒からなる抽出液、および核酸結合性固相担体を酸性条件下、好ましくはpH3～6、さらに好ましくはpH4付近にて添加、混合あるいは接触させることを特徴とする。

【0012】本発明において用いられる生物材料として

は、例えば組織や培養細胞、細菌培養物の他に、全血や血清、白血球等の血液成分、唾液、尿、精液等の体液が挙げられる。

【0013】本発明において使用するカオトロピック物質を含む溶解液には、緩衝剤を含有させることが好ましい。これは、予め溶解液に含まれていても、また、細胞を溶解した後に緩衝液として添加してもよい。この緩衝剤としては、一般に使用されるものであれば、特に限定されないが、pH3～6の範囲のいずれかのpHにおいて緩衝能を有するものがより好ましい。例えば、酢酸ナトリウム・酢酸、酢酸ナトリウム・塩酸等が挙げられ、その使用濃度としては1～500mM、pHは3～6の範囲が好適である。

【0014】本発明において用いられる溶解液には、カオトロピック物質が含まれる。このカオトロピック物質としては、一般にカオトロピック物質として知られているような、疎水性分子の水溶性を増加させる作用を有しており、さらにRNAの固相への結合に寄与するものであれば特に限定されない。具体的には、グアニジンチオシアン酸塩、グアニジン塩酸塩、よう化ナトリウム、よう化カリウム、過塩素酸ナトリウム等が挙げられる。これらのうち、RNAを分解するリボヌクレアーゼに対する阻害効果の大きいグアニジンチオシアン酸塩が好ましく用いられる。これらのカオトロピック物質の使用濃度は、用いられるカオトロピック物質により異なり、例えば、グアニジンチオシアン酸塩を使用する場合には、3～5.5Mの範囲となるように使用するのが好ましい。

【0015】また、カオトロピック物質を含む溶解液には、細胞膜の破壊あるいは細胞中に含まれるタンパク質を変性させる目的で、界面活性剤を含有させてもよい。この界面活性剤としては、一般に細胞等からの核酸抽出に使用されるものであれば、特に限定されないが、具体的には、ポリオキシエチレンオクチルフェニルエーテル、ポリオキシエチレンソルビタンモノラウレート、ポリオキシエチレンソルビタンモノオレエート等の非イオン界面活性剤、ドデシルトリメチルアンモニウムブロミド、ドデシルトリメチルアンモニウムクロリド、セチルトリメチルアンモニウムブロミド等の陽イオン界面活性剤、ドデシル硫酸ナトリウム、N-ラウロイルサルコシンナトリウム、コール酸ナトリウム等の陰イオン界面活性剤、ホスファチジルエタノールアミン等の両性界面活性剤が挙げられる。これらのうち、N-ラウロイルサルコシンナトリウムが好ましく用いられる。これらの界面活性剤の使用濃度は、用いられる界面活性剤により異なり、例えば、N-ラウロイルサルコシンナトリウムを使用する場合には、0.1～2%の範囲となるように使用するのが好ましい。

【0016】本発明において用いられる有機溶媒としては、RNAの固相への結合を妨げるものでなく、かつDNAの固相への結合を妨げるものであれば、特に限定さ

れない。この原理についての詳細は不明であるが、有機溶媒を液相に添加することにより液相の極性を適度に下げ、そのことによって、分子表面の極性が異なるRNAとDNAに固相との結合の選択性を付与しているものとする。本発明において用いられる有機溶媒の具体例としては、水飽和フェノール、緩衝液飽和フェノール、クロロホルム、メタノール、エタノール、1-プロパノール、2-プロパノール、1-ブタノール、3-メチル-1-プロパノール、アセトン等が挙げられる。これらのうち、水飽和フェノールのみ、あるいは水飽和フェノールとクロロホルムを適当な割合で混合したものが好ましい。

【0017】本発明において用いられる核酸結合性固相担体としては、カオトロピックイオンの存在下で核酸を吸着、すなわち可逆的な結合により保持することができる親水性表面を有する担体であれば、特に限定されない。具体的には、二酸化ケイ素、すなわちシリカが好ましく用いられる。また、前記のような核酸との可逆的な結合を妨げるようなものでなければ、シリカから構成される他の物質、例えばガラス、ケイソウ土、あるいはこれらを化学的修飾により表面処理を施したものや、超常磁性金属酸化物等の他の物質との複合体も含まれる。また、この核酸結合性固相担体の形態としては、粒子、フィルター、反応容器等が具体的に挙げられるが特に限定されない。これらのうち、吸着と溶出の効率を考慮すると粒子の形態がより好ましく、このとき粒径は0.05～500 μm がより好適である。

【0018】(b)洗浄工程は、上記(a)における生物材料、溶解液、有機溶媒、核酸結合性固相担体の混合物から、RNAが吸着した核酸結合性固相担体のみを可能な限り分離する工程である。このとき、洗浄液を使用して約1～3回程度、繰り返し洗浄するのが好ましい。

【0019】本発明における液相と固相との具体的な分離手段としては、使用する核酸結合性固相担体の形態により異なり、核酸結合性固相担体が粒子の形態である場合には、遠心分離、ろ過、カラム操作等が好ましい。さらには、粒子内に超常磁性金属酸化物を含ませておいたものを固相担体として使用すれば、磁石等を用いた簡便な磁気分離法が可能となり、より好適である。

【0020】本発明において用いられる洗浄液としては、固相担体からのプラスミドDNAの溶離を促進するものでなく、かつ、ゲノムDNAやタンパク質の固相への結合を妨げるものであれば特に限定されない。具体的には、3～5.5Mグアニジンチオシアン酸溶液あるいは40～100%エタノールが好ましく、これらの洗浄液を併用するとより好適である。つまり、まず、グアニジンチオシアン酸溶液で洗浄した後、さらに40～100%エタノールで洗浄するのが好ましい。また、初めに溶解・吸着工程にて使用した細胞溶解液および有機溶媒を洗浄液として使用すると、ゲノムDNAとタンパク質の除去により有効である。このとき、続いて40～10

0%エタノールで洗浄するのが好ましい。

【0021】(c)溶出工程は、上記(b)工程におけるRNAが吸着した核酸結合性固相担体から該RNAを溶離させる工程である。従って、本発明において用いられる溶出液としては、固相からのRNAの溶離を促進するものであれば、特に限定されない。具体的には、水あるいはTEバッファー[10mMトリス塩酸緩衝液、1mMEDTA、pH8.0]が好ましい。このとき回収したRNAは、透析やエタノール沈殿法等の脱塩、濃縮操作を施すことなく、逆転写酵素等を使用した酵素反応に直接使用することができる。

【0022】本発明によるRNAの抽出精製方法は、単純な工程から構成されるため、固相の分離操作や試薬分注操作を自動化した核酸抽出装置へ容易に応用しうる。

【0023】本発明のRNAの抽出精製試薬キットは、カオトロピック物質を含むpH3～6の溶解液、有機溶媒からなる抽出液、核酸結合性固相担体、洗浄液および溶出液を含む。

【0024】

【実施例】以下、実施例により本発明をさらに具体的に説明するが、本発明はこれらの実施例に限定されるものではない。

実施例1 HeLa細胞からのRNAの抽出精製

(1) HeLa細胞の調製

HeLa細胞を10%牛胎児血清(Gibco BRL社製)含有ダルベッコ変法イーグル培地(ニッスイ社製)培地15mlで37℃、4日間培養した。培養終了後、トリプシン処理により遊離した細胞を15ml容遠心分離管へ移し、1,000rpm、5分間遠心分離し、上清を除去した後、10mlのPBS[137mM塩化ナトリウム、2.7mM塩化カリウム、4.3mMリン酸水素ナトリウム、1.4mMリン酸二水素カリウム(pH7.4)]にて懸濁した。これについて細胞数を計測したところ 7×10^7 個であった。これをチューブ当たりの細胞数が 1×10^6 個となるように1.5ml容マイクロチューブに分注し、3,000rpm、5分間遠心分離し、上清を除去することにより得られた細胞ペレットを抽出材料とした。

【0025】(2) RNAの抽出精製

上記(1)にて調製した細胞に500 μl の細胞溶解液[4Mグアニジンチオシアン酸、25mMクエン酸ナトリウム(pH7.0)、0.5%N-ラウロイルサルコシナトリウム、0.1M2-メルカプトエタノール]を加えて溶解させ、続いて50 μl の2M酢酸ナトリウム-酢酸(pH4.0)、さらに500 μl の水飽和フェノールを加え、激しく混合した。これに、40 μl の0.5g/ml磁性シリカ粒子(粒径1～10 μm 、四酸化鉄粒子30%含有、比表面積280 m^2/g 、細孔容積0.025ml/g、表面細孔直径2～6nm：鈴木油脂社製)の懸濁液を添加し、室温で10分間混合した。次に、マイクロチューブを磁気スタンド(MPC-M：ダイナル社製)に設置して磁性シリカ粒子を

集め、上清を除去した。さらに、マイクロチューブを磁気スタンドから外し、1 mlの洗浄液[5.3Mグアニジンチオシアン酸、52mMトリス塩酸(pH6.4)]を加えて十分に混合した後、同様に磁気スタンドに設置して上清を除去することにより、粒子を洗浄した。同様にして、1 mlの洗浄液にて再度、粒子を洗浄し、続いて1 mlの70%エタノールで2回、100%エタノールで1回粒子を洗浄した。上清を除去した後、マイクロチューブを55℃に設定したヒートブロック上に設置し、20分間放置することによりチューブ内のエタノールを蒸発除去し、粒子を乾燥させた。これに100 µlの滅菌水を添加し、室温で10分間混合した後、磁気スタンドに設置して磁性シリカ粒子を集め、上清を回収した。回収液量はおよそ80 µlであった。

【0026】回収液のうち、10 µlをアガロースゲル電気泳動に供し、エチジウムブロミド染色後、写真撮影した結果を図1(レーン1)に示す。図1(レーン1)から明らかなように、本発明の方法により抽出されたRNAサンプル中には、ゲノムDNAの混入はほとんど認められず、本発明の方法によってRNAを純度よく抽出精製できることが確認できた。

【0027】(3) RT-PCRによるヒトトランスフェリンレセプターRNAの検出

上記(2)にて得られた回収液に対して、ヒトトランスフェリンレセプターRNAをターゲットにRT-PCRをおこなうことにより、回収液中のRNAの検出を試みた。RT-PCRは、市販の試薬キットRT-PCR high(東洋紡績社製)とヒトトランスフェリンレセプター増幅用プライマー(CL5407-1: Clontech社製)を使用して行った。まず、上記(2)にて得られた回収液のうち、10 µlにM-MLV逆転写酵素、逆転写用プライマーを含む逆転写用試薬を加え、最終液量を20 µlとし、これを42℃、20分間保温して逆転写反応をおこなった。また、並行して逆転写酵素を加えずに同様な操作をおこない、これを逆転写反応のネガティブコントロールとした。次に、逆転写後の反応液に耐熱性DNAポリメラーゼを含むPCR用試薬を加え、最終液量を100 µlとし、DNA Thermal Cycler(Perkin Elmer Cetus社製)にて95℃、1分間、56℃、1分間、72℃、1分間を30サイクル実施し、PCRをおこなった。反応液のうち、10 µlをアガロースゲル電気泳動に供し、エチジウムブロミド染色後、写真撮影した結果を図2に示す。図中、レーン1はランダムファージDNAのPstI消化物からなるサイズマーカー、レーン2は実施例1に示す方法により抽出精製されたRNAのRT-PCR増幅産物の泳動パターン、レーン3は逆転写反応のネガティブコントロールを使用したときのPCR増幅産物の泳動パターンを示す。図2から明らかなように、逆転写反応をおこなった反応液(レーン2)のみに増幅産物が見られ、本発明の方法によりRNAの抽出が可能

で、直ちにRT-PCRによる解析に使用できることが確認できた。

【0028】実施例2 C型肝炎ウイルス(HCV) RNAの抽出精製

(1) 1×10^7 コピー/mlのHCVが含まれている血清を陰性血清により希釈して $2 \times 10^5 \sim 2 \times 10^3$ コピー/mlの希釈系列をつくり、これらを抽出材料とした。各希釈系列の血清サンプル50 µl($1 \times 10^4 \sim 1 \times 10^2$ コピー相当)を使用して、実施例1と同様な方法によりRNAの抽出をおこなった。

【0029】(2) RT-PCRによるHCV・RNAの検出

上記(1)にて得られた回収液に対して、HCV・RNAの非翻訳領域をターゲットにRT-PCRをおこなうことにより、回収液中のHCV・RNAの検出を試みた。RT-PCRは、市販の試薬キットRT-PCR high(東洋紡績社製)を使用しておこなった。まず、(1)にて得られた回収液のうち5 µlにM-MLV逆転写酵素、逆転写用プライマーを含む逆転写用試薬を加え、最終液量を20 µlとし、これを42℃、60分間保温して逆転写反応をおこなった。次に、逆転写後の反応液に耐熱性DNAポリメラーゼを含むPCR用試薬を加え、最終液量を25 µlとし、DNA Thermal Cycler(Perkin Elmer Cetus社製)にて、まず、94℃、30秒間、53℃、30秒間、72℃、1分間を38サイクル、さらにPCR用試薬を加え、最終液量を30 µlとし、94℃、30秒間、50℃、1分間、72℃、1分間を28サイクル実施することにより、二段階のPCRをおこなった。反応液のうち、10 µlをアガロースゲル電気泳動に供し、エチジウムブロミド染色後、写真撮影した結果を図3に示す。図中、レーン1は、ラムダファージDNAのPstI消化物からなるサイズマーカー、レーン2～7は実施例2に示す方法により抽出精製されたRNAのRT-PCR増幅産物の泳動パターンであり、レーン2及びレーン3は 1×10^4 コピー、レーン4及びレーン5は 1×10^3 コピー、レーン6及びレーン7は 1×10^2 コピー相当のHCVを含む血清サンプルを使用したときの結果を示す。図3から明らかなように、 1×10^4 コピーおよび 1×10^3 コピー相当のHCVを含む血清サンプルについて増幅産物が見られ、本発明の方法により血清サンプルからのHCV・RNAの抽出が可能で、直ちにRT-PCRによる解析に使用できることが確認できた。

【0030】比較例1

従来法と比較して純度よくRNAを抽出精製できることを確認するため、カオトロピック物質とシリカ粒子を利用した従来法によりRNAの抽出を試みた。

実施例1(1)にて調製した細胞に、900 µlの細胞溶解液[4.7Mグアニジンチオシアン酸、46mMトリス塩酸(pH6.4)、1.2%ポリオキシエチレンオクチルフェニル

エーテル、20mM EDTA]を加えて溶解させ、続いて40 μ lの0.5mg/ml磁性シリカ懸濁液を添加し、室温で10分間混合した。次に、マイクロチューブを磁気スタンドに設置して磁性シリカを集め、上清を除去した。次いで、実施例(2)の方法と同様にして、1mlの洗浄液[5.3Mグアニジンチオシアン酸、52mMトリス塩酸(pH6.4)]で2回、1mlの70%エタノールで2回、100%エタノールで1回粒子を洗浄した。上清を除去した後、マイクロチューブを55℃に設定したヒートブロック上に設置し、20分間放置することによりチューブ内のエタノールを蒸発除去し、粒子を乾燥させた。これに100 μ lの滅菌水を添加し、室温で10分間混合した後、磁気スタンドに設置して磁性シリカ粒子を集め、上清を回収した。回収液量はおよそ80 μ lであった。回収液のうちの10 μ lをアガロースゲル電気泳動に供し、エチジウムブロミド染色後、写真撮影した結果を図1(レーン2)に示す。図1(レーン2)から明らかなように、比較例1に示した従来法より抽出されたサンプル中には、

ゲノムDNAが多量に混入することが確認された。

【0031】

【発明の効果】本発明によれば、適当な溶解液と核酸結合性固相を酸性条件下に使用することにより、生物材料に含まれるRNAを特異的に吸着させ、さらに適当な溶出液を使用することにより、煩雑な後処理操作を必要とすることなく該RNAを簡便に回収し、抽出精製できる。

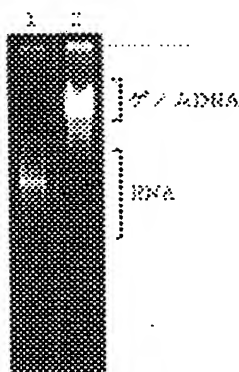
【図面の簡単な説明】

【図1】本発明の方法と従来法により、培養細胞から抽出精製されたRNAのアガロースゲル電気泳動パターンを示す図面に代える写真である。

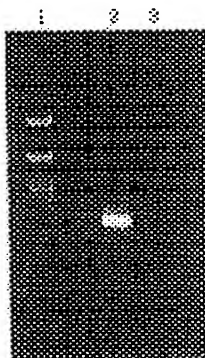
【図2】本発明の方法により、培養細胞から抽出精製されたRNAのRT-PCR増幅産物のアガロースゲル電気泳動パターンを示す図面に代える写真である。

【図3】本発明の方法により、HCV陽性血清から抽出精製されたRNAのRT-PCR増幅産物のアガロースゲル電気泳動パターンを示す図面に代える写真である。

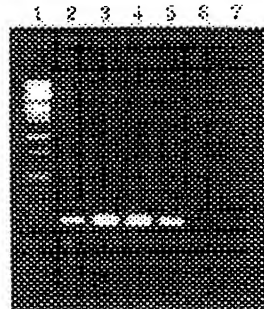
【図1】



【図2】



【図3】



フロントページの続き

(72)発明者 川上 文清

福井県敦賀市東洋町10番24号 東洋紡績株式会社敦賀バイオ研究所内

(72)発明者 川村 良久

福井県敦賀市東洋町10番24号 東洋紡績株式会社敦賀バイオ研究所内

[Title of the Invention] Method of extracting and purifying RNAs

[Claims]

[Claim 1] A method of extracting and purifying RNAs which comprises the following steps (a) to (c):

(a) the step of adding, mixing or contacting a cytolytic solution containing a chaotropic substance, an extractant comprising an organic solvent and a nucleic acid-binding solid phase carrier to or with a biological material such as cells under acidic conditions to thereby cause the RNAs contained in the biological material to be adsorbed on the solid phase,

(b) the step of washing the solid carrier with the RNAs adsorbed thereon in the above step (a) with a washing solution, and

(c) the step of eluting, with an eluent, the RNAs from the solid carrier washed in the above step (b).

[Claim 2] A method of extracting and purifying RNAs as set forth in Claim 1, wherein the acidic conditions consist in pH 3-6.

[Claim 3] A method of extracting and purifying RNAs as set forth in Claim 1, wherein the chaotropic substance-containing cytolytic solution has a pH of 3-6.

[Claim 4] A method of extracting and purifying RNAs as set forth in Claim 1, wherein the chaotropic substance is guanidine thiocyanate.

[Claim 5] A method of extracting and purifying RNAs as set forth in Claim 1, wherein the organic solvent is water-saturated or buffer-saturated phenol or chloroform or a combination of these.

[Claim 6] A method of extracting and purifying plasmid DNAs as set forth in Claim 1, wherein the nucleic acid-binding solid phase carrier is a silica-containing carrier.

[Claim 7] A method of extracting and purifying RNAs as set forth in Claim 1, wherein the nucleic acid-binding solid phase carrier occurs as particles.

[Claim 8] A method of extracting and purifying RNAs as set forth in Claim 1, wherein the nucleic acid-binding solid phase carrier occurs as superparamagnetic metal oxide-containing particles.

[Claim 9] A method of extracting and purifying RNAs as set forth in Claim 1, wherein the extractant is water or a TE buffer.

[Claim 10] A method of extracting and purifying RNAs as set forth in Claim 1,

wherein the nucleic acid-binding solid phase carrier is a superparamagnetic metal oxide-containing carrier, said method further comprising the step of separating the nucleic acid-binding solid phase carrier and the liquid phase from each other utilizing a magnetic force.

[Claim 11] A reagent kit for RNA extraction and purification which comprises a lyzing solution containing a chaotropic substance, a buffer solution having a pH of 3-6, an extractant comprising an organic solvent, a nucleic acid-binding solid phase carrier, a washing solution and an eluent.

[Detailed Description of the Invention]

[0001]

[Industrial Field of Utilization] The present invention relates to a method of extracting RNAs from a biological material such as cells in a simple and easy manner and at high purity levels using a nucleic acid-binding solid phase carrier and to an RNA extraction/purification reagent kit for use in said method. The reagent kit can be applied to an automated nucleic acid extraction apparatus as well.

[0002]

[Prior Art] Nucleic acid extraction/purification from such a biological material as nucleic acid-containing cells is an important step in the field of genetic engineering or clinical diagnosis. In the case of analyzing a gene, for instance, it is first necessary to extract a nucleic acid, namely DNA or RNA, from such a biological material as cells containing that gene. Further, in DNA/RNA diagnosis for detecting an infectious factor such as a bacterial or viral strain, it is also necessary to extract bacterial or viral nucleic acids from a biological material, typically blood, for detection of such matter. Generally, nucleic acids such as DNAs and RNAs contained in biological materials are not always in the free form but occur in such shells as cellular membranes and cell walls constituted of proteins, lipids and saccharides; in most cases, nucleic acids themselves occur as conjugates with proteins. Therefore, when nucleic acids are to be extracted and purified from a biological material, it is necessary to first render nucleic acids free by subjecting the material to physical disruption treatment by ultrasonic waves or heat, enzymatic treatment with protease, or treatment with a surfactant or denaturant, for instance, and then further purify the nucleic acids from the disruption product, for example, by an extraction procedure using an organic solvent such as phenol, ultracentrifugation, and/or column chromatography using such a carrier as an ion exchanger. These techniques are respectively optimized and are used in

combination according to the nucleic acids, the starting material and, further, the intended use of the nucleic acids extracted.

[0003] Generally and frequently used as the method of extracting and purifying RNAs from a biological material such as cells is the so-called AGPC method [Analytical Biochemistry 162, 156-159 (1987)]. This method is the method utilizing the steps of (1) adding guanidine thiocyanate and a solution containing phenol and chloroform in sequence to a biological material such as cells to disrupt the cell membrane or cell wall and denaturing proteins bound to nucleic acids and further distributing genomic DNAs into the organic phase, (2) separating the RNA-containing aqueous phase alone by centrifugation, (3) adding ethanol or isopropanol to this aqueous phase to render RNAs insoluble (ethanol precipitation or isopropanol precipitation method), and (4) further separating RNAs alone by centrifugation. As compared with the other RNA extraction/purification method utilizing the ultracentrifugation technique, this AGPC method is advantageous in that RNAs can be obtained in a short period of time and in a simple and easy manner. However, this method requires such complicated operations as centrifugation and aqueous phase separation and such a time-consuming step as ethanol precipitation or isopropanol precipitation and, therefore, when a number of samples are required to be analyzed rapidly in clinical diagnosis, for instance, a method by which RNAs can be extracted and purified in an easy and simple manner and in a short time is required.

[0004] On the other hand, there is a simple and easy method of extracting nucleic acids which uses silica as a nucleic acid-binding solid phase carrier [Japanese Kokai Publication H02-289596]. This method is advantageous in that nucleic acids can be extracted from a biological material such as cells in one step and, further, owing to the use, as the eluent, of water or a low-concentration buffer such as TE buffer, nucleic acids extracted can be directly used in the subsequent analysis, without such a procedure for desalting and concentration as ethanol precipitation. However, when an attempt is made to extract RNAs from cells by this method, not only RNAs but also genomic DNAs are adsorbed on the carrier silica and, therefore, genomic DNAs are found in large amounts, in addition to RNAs, in the liquid recovered. Therefore, for obtaining RNAs, it is essential to conduct a purification procedure, for example further enzyme treatment, ultracentrifugation or column chromatography.

[0005]

[Problems Which the Invention is to Solve] It is an object of the present invention

to solve the above-discussed problems encountered in the prior art and provide a method of extracting and purifying RNAs in a short time and at high purity levels from a biological material such as cells, without requiring any complicated operation.

[0006]

[Means for Solving the Problems] The present inventors made intensive investigations in an attempt to solve the above problems and, as a result, found that RNAs can be extracted and purified in a simple and easy manner from a biological material such as cells by using an appropriate lyzing solution having an appropriate pH, an appropriate organic solvent and an appropriate nucleic acid-binding solid phase carrier. Such finding has led to completion of the present invention.

[0007] Thus, the invention consists in a method of extracting and purifying RNAs which is characterized in that it comprises the following steps (a) to (c):

(a) the step of adding, mixing or contacting a lyzing solution containing a chaotropic substance, an extractant comprising an organic solvent and a nucleic acid-binding solid phase carrier, under acidic conditions, to or with a biological material such as cells to thereby cause RNAs contained in the biological material to be adsorbed on the solid carrier, (b) the step of washing the solid carrier with the RNAs adsorbed thereon in the above step (a) with a washing solution, and (c) the step of eluting, with an eluent, the RNAs from the solid carrier washed in the above step (b).

[0008] The method according to the invention may further comprise the step of separating the nucleic acid-binding solid phase carrier, which occurs as particles containing a superparamagnetic metal oxide, from the liquid phase by utilizing a magnetic force.

[0009] The present invention further consists in a reagent kit for RNA extraction and purification which comprises a lyzing solution containing a chaotropic substance, an extractant comprising an organic solvent, a nucleic acid-binding solid phase carrier, a washing solution and an eluent.

[0010]

[Modes of Embodiment of the Invention] The RNA extraction and purification method according to the invention is broadly divided into the following three stages: (a) dissolution/adsorption step, (b) washing step and (c) elution step.

[0011] In the dissolution/adsorption step (a), the cytolytic solution, organic solvent and nucleic acid-binding solid phase carrier are added to, mixed with or

contacted with a biological material such as cells under acidic conditions to dissolve or lyse the biological material and cause DNAs contained in the biological material to be adsorbed on the nucleic acid-binding solid phase. The lyzing solution, organic solvent and nucleic acid-binding solid phase carrier may be added to the biological material such as cells either separately or simultaneously. It is a characteristic feature of the invention that the chaotropic substance-containing lyzing solution, organic solvent-based extractant and nucleic acid-binding solid phase carrier are added to, mixed with or contacted with the biological material under acidic conditions, preferably at pH 3-6, more preferably at about pH 4.

[0012] As the biological material to be used in the practice of the invention, there may be mentioned, for example, tissues, cultured cells, bacterial cultures and, in addition, the whole blood or blood components such as serum and leukocytes, saliva, urine, semen and like body fluids.

[0013] The chaotropic substance-containing lyzing solution to be used in the practice of the invention preferably contains a buffer agent. This may be contained already in the lyzing solution or may be added in the form of a buffer solution after cell lysis. The buffer agent is not particularly restricted but may be any of those in general use, preferably those showing a buffering action at a pH within the range of 3-6. Thus, for example, sodium acetate-acetic acid, sodium acetate-hydrochloric acid and the like may be mentioned, and the concentration thereof to be employed is preferably 1-500 mM and the pH is preferably within the range of 3-6.

[0014] The lyzing solution to be used in the practice of the invention contains a chaotropic substance. The chaotropic substance is not particularly restricted but may be any of those substances which are generally known as chaotropic substances and are effective in increasing the solubility of hydrophobic molecules in water and further contribute to RNA binding to solid phases. Specifically, there may be mentioned guanidine thiocyanate, guanidine hydrochloride, sodium iodide, potassium iodide, sodium perchlorate, etc. Among these, guanidine thiocyanate, which is highly effective in inhibiting RNA-decomposing ribonucleases, is preferably used. The concentration to be employed of such chaotropic substances may vary depending on the chaotropic substance used and, in the case of guanidine thiocyanate, for instance, this is preferably used within the concentration range of 3-5.5 M.

[0015] The chaotropic substance-containing lyzing solution may contain a

surfactant so that the cell membrane may be destructed or the proteins contained in cells may be denatured. The surfactant is not particularly restricted but may be any of those generally used in nucleic acid extraction from cells or the like. Specifically, there may be mentioned nonionic surfactants such as polyoxyethylene octylphenyl ether, polyoxyethylenesorbitan monolaurate and polyoxyethylenesorbitan monooleate, cationic surfactants such as dodecyltrimethylammonium bromide, dodecyltrimethylammonium chloride and cetyltrimethylammonium bromide, anionic surfactants such as sodium dodecyl sulfate, N-lauroylsarcosine sodium and sodium cholate, and amphoteric surfactants such as phosphatidylethanolamine. Among these, N-lauroylsarcosine sodium is preferably used. The concentration to be employed of these surfactants may vary depending on the surfactant species used and, in the case of N-lauroylsarcosine sodium, for instance, this is preferably used within the concentration range of 0.1%-2%.

[0016] The organic solvent to be used in the practice of the invention is not particularly restricted but may be any one that will not inhibit RNA binding to the solid phase but can inhibit DNA binding to the solid phase. Presumably, the addition of such an organic solvent to the liquid phase properly decreases the polarity of the liquid phase to thereby provide RNAs and DNAs differing in molecular surface polarity with selectivity in solid phase binding, although the details of this principle are unknown. As specific examples of the organic solvent to be used in the practice of the invention, there may be mentioned water-saturated phenol, buffer solution-saturated phenol, chloroform, methanol, ethanol, 1-propanol, 2-propanol, 1-butanol, 3-methyl-1-propanol and acetone. Among these, water-saturated phenol alone or a mixture of water-saturated phenol and chloroform in an appropriate mixing ratio is preferred.

[0017] The nucleic acid-binding solid phase carrier to be used in the practice of the invention is not particularly restricted but may be any solid that has a hydrophilic surface capable of adsorbing nucleic acids in the presence of a chaotropic ion, namely retaining them through reversible bonding. Specifically, silicon dioxide, namely silica, is preferably used. The carrier also includes silica-based substances, for example glass and diatomaceous earth, chemical modifications or surface-treated modifications thereof, and composites thereof with such other substances as superparamagnetic metal oxides unless they inhibit such reversible binding with nucleic acids as mentioned above. The form of the nucleic acid-binding solid phase carrier is not particularly restricted but

specifically includes particles, filters and reaction vessels. Among these, the form of particles is more preferred from the adsorption and elution efficiency viewpoint and, in that case, the particle diameter is more suitably 0.05-500 μm .

[0018] The washing step (b) is the step of separating only the nucleic acid-binding solid phase carrier with RNAs adsorbed thereon as far as possible from the mixture comprising the biological material, lyzing solution, organic solvent and nucleic acid-binding solid phase carrier as obtained in the above step (a). On that occasion, the carrier is preferably washed about 1-3 times using a washing solution.

[0019] The specific means for separating the liquid phase and solid phase from each other in the practice of the invention depends on the form of the nucleic acid-binding solid phase carrier employed. When the nucleic acid-binding solid phase carrier is in the form of particles, for instance, centrifugation, filtration or column operation is preferred among others. Further, when a solid phase carrier containing a superparamagnetic metal oxide within particles thereof is used, magnetic separation using a magnet or the like, which is simple and easy, becomes possible and is more appropriate.

[0020] The washing solution to be used in the practice of the invention is not particularly restricted but may be any one that will not promote plasmid DNA elution from the solid phase carrier but can prevent genomic DNA or protein binding to the solid phase. Specifically, a 3-5.5 M guanidine thiocyanate solution or 40%-100% ethanol is preferred, and the combined use of these washing solutions is more preferred. Thus, preferably, the solid phase is first washed with a guanidine thiocyanate solution and then further with 40%-100% ethanol. Further, when the cytolytic solution and organic solvent first used in the dissolution/adsorption step are used as washing solutions, genomic DNAs and proteins are more effectively removed. On that occasion, 40%-100% ethanol is preferably used in the subsequent washing.

[0021] The elution step (c) is the step of eluting the RNAs from the nucleic acid-binding solid phase carrier with those RNAs adsorbed thereon. Therefore, the eluent to be used in the practice of the invention is not particularly restricted but may be any one that promotes the elution of the RNAs from the solid phase. Specifically, water or TE buffer [10 mM Tris-hydrochloride buffer, 1 mM EDTA, pH 8.0] is preferred. The RNAs then recovered can be directly used in an enzymatic reaction using a reverse transcriptase, for instance, without subjecting the same to a desalting or concentration procedure by dialysis or ethanol

precipitation.

[0022] The RNA extraction/purification method according to the invention is constituted of simple steps and can obviously be applied to nucleic acid extraction apparatus in which the solid phase separation and reagent distribution procedures are carried out automatically.

[0023]

[Examples] The following examples illustrate the present invention more specifically. These examples are, however, by no means limitative of the scope of the invention.

[0024]

Example 1 RNA extraction and purification from HeLa cells

(1) Preparation of HeLa cells

HeLa cells were cultivated in 15 ml of Dulbecco's modified Eagle medium (product of Nissui) containing 10% of fetal calf serum (product of Gibco BRL) at 37°C for 4 days. After completion of the cultivation, the cells released by trypsin treatment were transferred to a 15-ml centrifuge tube, followed by 5 minutes of centrifugation at 1,000 rpm. After removing the supernatant, the cells were suspended in 10 ml of PBS [137 mM sodium chloride, 2.7 mM potassium chloride, 4.3 mM disodium hydrogen phosphate, 1.4 mM potassium dihydrogen phosphate (pH 7.4)]. The number of cells the suspension was counted and found to be 7×10^7 . The suspension was distributed into 1.5-ml microtubes so that the number of cells might amount to 1×10^6 per tube and centrifuged at 3,000 rpm for 5 minutes. Each cell pellet obtained after removal of the supernatant was used as the extraction material.

[0025] (2) RNA extraction/purification

The cells prepared in the above step (1) were lysed by adding thereto 500 µl of a cytolytic solution [4 M guanidine thiocyanate, 25 mM sodium citrate (pH 7.0), 0.5% N-lauroylsarcosine sodium, 0.1 M 2-mercaptoethanol]. Then, 50 µl of 2 M sodium acetate-acetic acid (pH 4/0) was added and 500 µl of water-saturated phenol was further added, and the mixture was stirred vigorously. Thereto was added 40 µl of a 0.5 g/ml suspension of magnetic silica particles (particle diameter 1-10 µm, containing 30% of triiron tetraoxide, specific surface area 280 m²/g, pore volume 0.025 ml/g, surface pore diameter 2-6 nm; product of Suzuki Yushi), followed by 10 minutes of stirring at room temperature. Then, each microtube was placed on a magnetic stand (MPC-M; product of Dynal), the magnetic silica particles were collected, and the supernatant was discarded. Further, the

microtube was removed from the magnetic stand, 1 ml of a washing solution [5.3 M guanidine thiocyanate, 52 mM Tris-hydrochloride (pH 6.4)] was added and, after thorough mixing, the microtube was placed on the magnetic stand in the same manner, and the particles were washed by removing the supernatant. The particles were again washed with 1 ml of the washing solution in the same manner and then washed with two 1-ml portions of 70% ethanol and with one portion of 100% ethanol. After removal of the supernatant, the microtube was placed on a heat block set at 55°C and allowed to stand for 20 minutes to thereby evaporate off the ethanol in the tube and dry the particles. Thereto was added 100 µl of sterilized water and, after 10 minutes of stirring at room temperature, the mixture was placed on the magnetic stand, the magnetic silica particles were collected and the supernatant was recovered. The liquid recovered amounted to about 80 µl.

[0026] A 10-µl portion of the liquid recovered was subjected to agarose gel electrophoresis, followed by staining with ethidium bromide and photography. The results are shown in Fig. 1 (lane 1). As is evident from Fig. 1 (lane 1), it could be confirmed that the RNA sample extracted by the method of this invention showed almost no contamination with genomic DNAs and that RNAs can be extracted and purified at good purity levels by the method of the invention.

[0027] (3) Detection of human transferrin receptor RNA by RT-PCR

An attempt to detect a RNA in the recovered liquid obtained in the above step (2) was made by subjecting the same to RT-PCR with the human transferrin receptor RNA as the target. The RT-PCR was carried out using the commercial reagent kit RT-PCR high (product of Toyobo) and a human transferrin receptor amplification primer (CL5407-1; product of Clontech). First, a reverse transcription reagent containing M-MLV reverse transcriptase and the primer for reverse transcription was added to 10 µl of the recovered liquid obtained in the above step (2) to make the final liquid amount 20 µl and the reverse transcription reaction was carried out by maintaining the mixture at 42°C for 20 minutes. The same procedure was conducted in parallel without adding the reverse transcriptase and this was used as a negative control for the reverse transcription reaction. Then, a PCR reagent containing a thermostable DNA polymerase was added to the reaction mixture after reverse transcription to make the final liquid amount 100 µl, and the PCR was carried out using DNA Thermal Cycler (product of Perkin Elmer Cetus) in 30 cycles each comprising 1 minute of heating at 95°C, 1 minute of heating at 56°C and 1 minute of heating at 72°C. A 10-µl portion of the reaction mixture was subjected to electrophoresis, followed by ethidium bromide staining

and photography. The results are shown in Fig. 2. In the figure, lane 1 shows size markers comprising PstI digests of the lambda phase DNA, lane 2 the electrophoretic pattern of the RT-PCR amplification product based on the RNA extracted and purified by the method described in Example 1, and lane 3 the electrophoretic pattern of the PCR amplification product as obtained using the negative control for the reverse transcription reaction. As is evident from Fig. 2, the amplification product was observed only when the reverse transcription reaction was carried out using the reaction mixture (lane 2); thus, it could be confirmed that RNA extraction is possible by the method according to the invention and the extraction product can be immediately used in analysis by RT-PCR.

[0028] Example 2 Extraction and purification of hepatitis C virus (HCV) RNA

(1) A serum sample containing 1×10^7 copies/ml of HCV was diluted with negative serum to give a dilution series with 2×10^5 to 2×10^3 copies/ml, and these dilutions were used as extraction materials. Using 50 μ l (corresponding to 1×10^4 to 1×10^2 copies) of each serum sample in the dilution series, RNA extraction was carried out in the same manner as in Example 1.

[0029] (2) Detection of HCV RNA by RT-PCR

Using each recovered liquid obtained in the above step (1), the RT-PCR was carried out with the untranslated region of the HCV RNA as the target in an attempt to detect the HCV RNA in the recovered liquid. The RT-PCR was carried out using the commercial reagent kit RT-PCR high (product of Toyobo). First, a reverse transcription reagent containing M-MLV reverse transcriptase and a primer for reverse transcription was added to 5 μ l of the recovered liquid obtained in the above step (1) to make the final liquid amount 20 μ l and the reverse transcription reaction was carried out by maintaining the mixture at 42°C for 20 minutes. Then, a PCR reagent containing a thermostable DNA polymerase was added to the reaction mixture after reverse transcription to make the final liquid amount 25 μ l, and the PCR was carried out using DNA Thermal Cycler (product of Perkin Elmer Cetus) in 2 stages, namely first in 38 cycles each comprising 30 seconds of heating at 94°C, 30 seconds of heating at 53°C and 1 minute of heating at 72°C and, after further addition of the PCR reagent to make the final liquid amount 30 μ l, in 28 cycles each comprising 30 seconds of heating at 94°C, 1 minute of heating at 50°C and 1 minute of heating at 72°C. A 10- μ l portion of the reaction mixture was subjected to electrophoresis, followed by ethidium bromide staining and photography. The results are shown in Fig. 3. In the figure, lane 1

shows size markers comprising PstI digests of the lambda phase DNA, and lanes 2-7 show the electrophoretic patterns of the RT-PCR amplification products based on the RNA extracted and purified by the method described in Example 2. Lanes 2 and 3 show the results obtained by using a serum sample containing HCV in an amount corresponding to 1×10^4 copies, lanes 4 and 5 show the results obtained by using 1×10^3 copies, and lanes 6 and 7 show the results obtained by using 1×10^2 copies. As is evident from Fig. 3, the amplification product was observed with the serum samples containing HCV in an amount corresponding to 1×10^4 copies or 1×10^3 copies; thus, it could be confirmed that the HCV RNA can be extracted from such serum samples by the method according to the invention and the extraction product can be immediately used in analysis by RT-PCR.

[0030] Comparative Example 1

For confirming that RNA extraction/purification can be carried out at better purity levels as compared with the conventional method, RNA extraction was attempted by the conventional method using a chaotropic substance and silica particles.

The cells prepared in Example 1 (1) were lysed by adding thereto 900 μ l of a cytolytic solution [4.7 M guanidine thiocyanate, 46 mM Tris-hydrochloride (pH 6.4), 1.2% polyoxyethylene octylphenyl ether, 20 mM EDTA], 40 μ l of a 0.5 mg/ml magnetic silica suspension was then added, and the mixture was stirred at room temperature for 10 minutes. Then, the microtube was placed on the magnetic stand, where by the magnetic silica was collected and the supernatant was removed. Then, the particles were washed with two 1-ml portions of a washing solution [5.3 M guanidine thiocyanate, 52 mM Tris-hydrochloride (pH 6.4)], two 1-ml portions of 70% ethanol and one portion of 100% ethanol. After removal of the supernatant, the microtube was placed on a heat block set at 55°C and allowed to stand there for 20 minutes to dry the particles by evaporating off the ethanol in the tube. To the particles was added 100 μ l of sterilized water, the tube was placed on the magnetic stand to collect magnetic silica particles and the supernatant was recovered. The liquid recovered amounted to about 80 μ l. A 10- μ l portion of the liquid recovered was subjected to agarose gel electrophoresis, followed by ethidium bromide staining and photography. The results are shown in Fig. 1 (lane 2). As is evident from Fig. 1 (lane 2), it was confirmed that the sample extracted by the conventional method shown in Comparative Example 1 contained genomic DNAs in large amounts.

[0031]

[Effects of the Invention] According to the invention, RNAs can be recovered and extracted/purified in a simple and easy manner by causing specific adsorption of the RNAs using an appropriate lyzing solution and an appropriate nucleic acid-binding solid phase under acidic conditions and further using an appropriate eluent, without the necessity of any complicated after-treatment procedure.

[Brief Description of the Drawings]

[Fig. 1] This is a photograph, in lieu of a drawing, showing the agarose gel electrophoretic patterns of the RNAs extracted and purified from cultured cells by the method of the invention and by the conventional method, respectively.

[Fig. 2] This is a photograph, in lieu of a drawing, showing the agarose gel electrophoretic pattern of the RT-PCR amplification product from a RNA extracted and purified from cultured cells by the method of the invention.

[Fig. 3] This is a photograph, in lieu of a drawing, showing the agarose gel electrophoretic pattern of the RT-PCR amplification product from a RNA extracted and purified from HCV-positive serum by the method of the invention.

